

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791499

研究課題名（和文）癌間質由来 KGF を標的とした再燃前立腺癌の新規治療戦略

研究課題名（英文）A new therapeutic strategy for targeting carcinoma-associated fibroblast-derived KGF in castration resistant prostate cancer

研究代表者

石井 健一郎 (Ishii, Kenichiro)

三重大学・大学院地域イノベーション学研究所・研究員

研究者番号：90397513

研究成果の概要（和文）：本研究により、前立腺間質 PrSC では TGFβシグナルの活性化に伴う筋線維芽細胞様の分化誘導が、間質由来 KGF mRNA の産生を低下させることが判明した。よって、再燃前立腺癌の増殖過程では、癌細胞を取り巻く間質細胞の種類が重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Our results showed that TGFβ-induced myofibroblastic differentiation in PrSC reduced the expression of KGF mRNA. Thus, we suggest that type of stromal cells surrounding cancer cells may be important in the progression of castration resistant prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：再燃前立腺癌、癌間質、KGF、線維芽細胞、筋線維芽細胞、TGFβ

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺は、高齢男性において癌および肥大症といった異常増殖性病変をきたすことから臨床的に重要な臓器である。特に、近年の人口の高齢化に伴い、前立腺癌や前立腺肥大症の増加は、欧米のみならず本邦においても医療社会的にも注目されている。前立腺は男性ホルモン（アンドロゲン）依存性の臓器であり、前立腺の発生・分化・成長には精巣から分泌されるアンドロゲンが必要不可欠である。これまでに報告された動物実験の結果から、アンドロゲンは前立腺癌の発生にも重要な役割を果たしていると考えられているものの、疫学研究では

この仮説に一致する結果は得られていない。実際、加齢に伴う精巣機能の低下、それに伴う血中アンドロゲンレベルの低下にも関わらず、前立腺癌や前立腺肥大症といった増殖性病変を高頻度に認める。

前立腺癌は、精巣や副腎から産生・分泌されるアンドロゲンの影響を受けることは周知の事実である。実際、精巣を外科手術的に除去する（除睾術）か、LH-RH アナログによりアンドロゲンの産生・分泌を遮断すると癌細胞の増殖が低下する。また、癌細胞におけるアンドロゲン作用を遮断する抗アンドロゲン剤も癌細胞の増殖を抑制するために有用である。しかし、これら内分泌療法の問題

点は、長く治療を続けていると、いずれは反応性が弱くなり、落ち着いていた病状がぶり返す、治療抵抗性になることである(再燃)。現在、内分泌療法に抵抗性を示す再燃前立腺癌を制することが重要な課題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、再燃前立腺癌の新規治療戦略として癌間質由来 keratinocyte growth factor (KGF) が標的となり得るか否かを検証するために、まず、*in vitro* の細胞培養において間質由来 KGF の産生・分泌が阻害される条件、もしくは低下させる生体内物質・低分子化合物を探索する。最終的には、*in vivo* 腫瘍形成実験でアンドロゲン不応性前立腺癌細胞の腫瘍形成を抑制できるか否かを評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【方法1: 正常ヒト前立腺ストローマ細胞の培養】

正常ヒト前立腺ストローマ細胞 PrSC を Lonza社から購入し、ストローマ細胞培地キット (SCGM<sup>™</sup> BulletKit<sup>®</sup>) にて継代維持した。

### 【方法2: *in vivo* 腫瘍形成試験】

I 型コラーゲン中にて PrSC を、アンドロゲン感受性ヒト前立腺癌由来培養細胞 LNCaP か、その亜株 E9 (アンドロゲン低感受性)、AIDL (アンドロゲン不応性) と混合し、雄ヌードマウス (8 ~ 10 週齢) の腎被膜下へ移植し、4 週間後に腫瘍を回収した。

### 【方法3: 遺伝子発現解析】

生体内物質もしくは低分子化合物による間質の分化マーカーや KGF mRNA 発現量の変化は、Applied Biosystems 社の TaqMan probe とリアルタイム PCR システム StepOne を用いて測定し、無処理群と比較検討した。

## 4. 研究成果

本研究では、申請者が常用してきた癌間質モデル urogenital sinus mesenchyme (UGM) の代替細胞として、市販の正常ヒト前立腺ストローマ細胞 PrSC が *in vivo* 腫瘍形成を促進させるか否かを検討した。さらに、PrSC 由来 KGF の産生が阻害される条件、もしくは低下させる生体内物質・低分子化合物の探索を行った。

### 【主題1: PrSC の性状解析】

まず、PrSC における mRNA 発現を解析したところ、PrSC は vimentin (+), collagen (+), tenascin-C (+),  $\alpha$ SMA (+), myosin (-), desmin (-) といった線維芽細胞〜筋線維芽細胞

の性質を有していることを確認した。

次に、*in vivo* 腫瘍形成試験において、PrSC は LNCaP, E9, AIDL の *in vivo* 腫瘍形成を有意に促進することを確認した。よって、ラット胎児から採取していた癌間質モデル UGM の代替細胞として、市販の培養細胞 PrSC が使用可能と判断した。

### 【主題2: PrSC 由来 KGF の産生阻害】

PrSC を性ステロイドホルモン (DHT, E<sub>2</sub>)、サイトカイン (TGF $\beta$ , SHH)、アドレナリン受容体アゴニスト (PE) で処理したところ、TGF $\beta$  処理群でのみ KGF mRNA の有意な発現減少を確認した。TGF $\beta$  は線維芽細胞に筋様の細胞分化を誘導することが知られたサイトカインである。よって、癌細胞を取り巻く環境が線維芽細胞 > 筋線維芽細胞かどうか、再燃前立腺癌の増殖過程に KGF が強く関与するか否かが決まると考えられた。

### 【主題3: PrSC に対する前立腺肥大症治療薬 ( $\alpha_1$ 受容体遮断薬) の影響】

本研究では、本邦で頻用される前立腺肥大症治療薬 ( $\alpha_1$  受容体遮断薬) として、naftopidil, tamsulosin, silodosin を使用した。

*in vitro* 細胞増殖試験において、naftopidil は PrSC の細胞増殖を強く抑制したが、tamsulosin および silodosin による増殖抑制作用は認められなかった。このとき、PrSC における KGF および IGF-I mRNA 産生に変化は認められなかった。naftopidil 処理群でのみ、IL-6 のタンパク質量が有意に減少した。また、E9+PrSC の *in vivo* 腫瘍形成は、naftopidil 投与により有意に抑制されたが、tamsulosin および silodosin による抑制作用は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y. Endocrine disrupter bisphenol A increases *in situ* estrogen production in mouse urogenital sinus. *Biology of Reproduction* (in press) (equal contributor) (査読あり)
- 2) Horii Y, Ishii K, Kanda H, Iwamoto Y, Nishikawa K, Soga N, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Naftopidil, a subtype selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist, suppresses human prostate

- tumor growth by altering interactions between tumor cells and stroma. *Cancer Prevention Research*, 4: 87-96, 2011. (査読あり)
- 3) Yoshio Y, **Ishii K**, Arase S, Hori Y, Nishikawa K, Soga N, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Effect of transforming growth factor  $\alpha$  overexpression on urogenital organ development in mouse. *Differentiation*, 80: 82-88, 2010. (査読あり)
  - 4) Imamura T, **Ishii K**, Kanda H, Arase S, Yoshio Y, Hori Y, Soga N, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Structural changes in alpha-adrenoceptor antagonist-treated human prostatic stroma. *Clinical and Experimental Medicine*, 10: 99-106, 2010. (equal contributor) (査読あり)
  - 5) Tanaka ST, **Ishii K**, DeMarco RT, Pope JC 4<sup>th</sup>, Brock JW 3<sup>rd</sup>, Hayward SW. Endodermal origin of bladder trigone inferred from mesenchymal-epithelial interactions. *Journal of Urology*, 183: 386-391, 2010. (査読あり)
  - 6) Li X, Wang Y, Sharif-Afshar AR, Uwamariya C, Yi A, **Ishii K**, Hayward SW, Matusik RJ, Bhowmick NA. Adult urothelial transdifferentiation to prostate epithelia is mediated by paracrine TGF- $\beta$  signaling. *Differentiation*, 77: 95-102, 2009. (査読あり)
  - 7) **Ishii K**, Imamura T, Iguchi K, Arase S, Yoshio Y, Arima K, Hirano K, Sugimura Y. Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth *in vivo*. *Endocrine-Related Cancer*, 16: 415-428, 2009. (査読あり)
- [学会発表] (計 25 件)
- 1) 第 20 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 23 年 3 月 11-12 日・津市)  
ヒト前立腺癌間質モデルの作製と発生メカニズムの解析  
**石井 健一朗**、溝上 敦、西川 晃平、岩本 陽一、加藤 学、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、並木 幹夫、杉村 芳樹
  - 2) 第 20 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 23 年 3 月 11-12 日・津市)  
前立腺癌組織における新規神経内分泌物質 Manserin 発現の検討  
西川 晃平、曾我 倫久人、加藤 学、岩本 陽一、**石井 健一朗**、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
  - 3) 第 26 回 前立腺シンポジウム (平成 22 年 12 月 11-12 日・品川)  
胎生期ビスフェノール A 曝露による前立腺の異常増殖機構  
**石井 健一朗**、荒瀬 栄樹、吉尾 裕子、杉村 芳樹 (指定演題)
  - 4) 第 69 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 22 年 9 月 22-24 日・大阪市)  
Heterogeneity of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts  
**石井 健一朗**、堀 靖英、溝上 敦、山田 泰司、有馬 公伸、並木 幹夫、杉村 芳樹
  - 5) 第 69 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 22 年 9 月 22-24 日・大阪市)  
Experimental approach targeting tumor-stromal interactions in prostate cancer microenvironment  
杉村 芳樹、**石井 健一朗** (指定演題)
  - 6) 第 69 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 22 年 9 月 22-24 日・大阪市)  
Phenylpiperazine derivatives induce G1 cell cycle arrest in human prostate cancer cells and stromal cells  
堀 靖英、**石井 健一朗**、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
  - 7) 38<sup>th</sup> Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers (ISOBM) (平成 22 年 9 月 3-8 日・Munchen)  
Characterization of androgen-low sensitive LNCaP subline, LNCaP-E9 cells  
Kazuhiro Iguchi, Kazuhiro Fukami, **Kenichiro Ishii**, Shigeyuki Usui, Yoshiki Sugimura, Kazuyuki Hirano
  - 8) 第 3 回 前立腺生物学シンポジウム (平成 22 年 6 月 17-18 日・鳥羽市)  
胎生期ビスフェノール A 曝露による前立腺の異常増殖機構  
**石井 健一朗** (指定演題)
  - 9) The 2010 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 22 年 5 月 28 日-6 月 3 日・San Francisco)  
Biological effects of fetal exposure to bisphenol A on urogenital sinus  
**Kenichiro Ishii**, Shigeki Arase, Yuko Yoshio, Katsuhide Igarashi, Kenichi Aisaki, Yasuhide Hori, Kohei Nishikawa, Norihito Soga, Hideaki Kise, Kiminobu Arima, Jun Kanno, Yoshiki Sugimura
  - 10) The 2010 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平

- 成 22 年 5 月 28 日-6 月 3 日・San Francisco)
- Unique growth-inhibitory effects of subtype selective  $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonists on human prostate cancer cells  
Yasuhide Hori, **Kenichiro Ishii**, Hideki Kanda, Kohei Nishikawa, Yuko Yoshio, Norihito Soga, Hideaki Kise, Kiminobu Arima, Jun Kanno, Yoshiki Sugimura
- 11) 第 98 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 22 年 4 月 26-30 日・盛岡市)  
 $\alpha 1a$  アドレナリン受容体選択性遮断薬 Silodosin による癌微小環境を標的とした前立腺癌増殖抑制メカニズム  
堀 靖英、**石井 健一朗**、神田 英輝、西川 晃平、吉尾 裕子、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 12) 第 98 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 22 年 4 月 26-30 日・盛岡市)  
前立腺基底上皮細胞の生物学的特性：増殖因子と性ホルモンの影響  
吉尾 裕子、**石井 健一朗**、堀 靖英、西川 晃平、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 13) 第 19 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 22 年 2 月 19-20 日・神戸市)  
サブタイプ選択性  $\alpha 1$  アドレナリン受容体遮断薬による受容体非依存的な前立腺癌増殖抑制作用  
堀 靖英、**石井 健一朗**、神田 英輝、西川 晃平、吉尾 裕子、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 14) 第 19 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 22 年 2 月 19-20 日・神戸市)  
エストロゲン様化学物質誘導性マウス前立腺基底上皮細胞の異常増殖における EGFR リガンドの作用  
吉尾 裕子、**石井 健一朗**、堀 靖英、西川 晃平、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 15) 第 25 回 前立腺シンポジウム (平成 21 年 12 月 12-13 日・品川)  
前立腺間質、正常上皮および癌間質のネットワーク構成の比較—前立腺癌ファイールドエフェクトの解析—  
角田俊之、**石井 健一朗**、杉村 芳樹、内藤 誠二 (指定演題、石井が発表)
- 16) 19th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 21 年 11 月 5-8 日・New Orleans)  
Biological effects of fetal exposure to bisphenol A on urogenital sinus  
**Kenichiro Ishii**, Shigeki Arase, Katsuhide Igarashi, Kenichi Aisaki, Yuko Yoshio, Yasuhide Hori, Kohei Nishikawa, Norihito Soga, Hideaki Kise, Kiminobu Arima, Jun Kanno, Yoshiki Sugimura
- 17) 第 68 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 21 年 10 月 1-3 日・横浜市)  
Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of normal human prostatic fibroblasts  
**石井 健一朗**、角田 俊之、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 18) 第 68 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 21 年 10 月 1-3 日・横浜市)  
Unique growth-inhibitory effects of subtype selective  $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonists on human prostate cancer cells  
堀 靖英、**石井 健一朗**、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 19) 第 4 回 Basic Urology Research Seminar (平成 21 年 8 月 22 日・浅草)  
癌間質を標的にした再燃前立腺癌に対する新規治療戦略  
**石井 健一朗** (指定演題)
- 20) 第 28 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 21 年 7 月 3-4 日・富山市)  
ホルモン依存性喪失ヒト前立腺癌細胞モデルを用いた再燃前立腺癌の増殖メカニズム解析  
**石井 健一朗**、井口 和弘、深見 和宏、吉尾 裕子、堀 靖英、西川 晃平、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、平野 和行、杉村 芳樹
- 21) The 2009 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 21 年 4 月 25-30 日・Chicago)  
A new therapeutic strategy for targeting tumor stroma in hormone-refractory prostate cancer cell growth under androgen ablation therapy  
**Kenichiro Ishii**, Tetsuya Imamura, Kazuhiro Iguchi, Shigeki Arase, Yuko Yoshio, Yasuhide Hori, Kiminobu Arima, Kazuyuki Hirano, Yoshiki Sugimura
- 22) The 2009 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 21 年 4 月 25-30 日・Chicago)  
Stromal tenascin-C signal regulates mouse prostatic development and epithelial cell differentiation  
**Kenichiro Ishii**, Kyoko Imanaka-Yoshida, Tetsuya Imamura, Shigeki Arase, Yuko Yoshio, Yasuhide Hori, Kiminobu Arima, Toshimichi Yoshida, Yoshiki Sugimura

- 23) 第 97 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 21 年 4 月 16-19 日・岡山市)  
TGF $\alpha$ 過発現マウス前立腺の病理組織学的解析  
石井 健一郎、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、今村 哲也、堀 靖英、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 24) 第 97 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 21 年 4 月 16-19 日・岡山市)  
マウスゼノグラフトモデルを用いた前立腺肥大症組織に対する各種薬剤の影響評価  
今村 哲也、石井 健一郎、荒瀬 栄樹、吉尾 裕子、堀 靖英、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 25) 第 97 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 21 年 4 月 16-19 日・岡山市)  
ビスフェノール A 経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定  
荒瀬 栄樹、石井 健一郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹

[図書] (計 1 件)

- 1) 石井 健一郎、角田俊之、内藤 誠二、杉村 芳樹. “前立腺間質、正常上皮および癌間質間のネットワーク構成の比較—前立腺癌フィールドエフェクトの解析—”. 泌尿器外科 23 (8), 1025-1027, 2010 年 8 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 健一郎 (Ishii, Kenichiro)  
三重大学・大学院地域イノベーション学研究科・研究員  
研究者番号：90397513

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし